

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *beaker glass* 100 mL, 500 mL dan 1000 mL, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, pipet serologis, bola hisap, sendok bahan, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kain blacu, cuvet, gunting, erlenmeyer 250 mL, *hot plate*, inkubator, timbangan digital, baskom, pisau bedah, spektrofotometer UV Visible merk Spectroquant Pharo 300, *microplate reader*, ELISA reader, *centrifuges* merk Heraeus, *glucometer* merk Gluco Dr model AGM-2100 dan *waterbath* merk Memmert tipe W 350.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Sargassum* sp. dari kepulauan Talango, Sumenep, Madura, tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*) 2-3 bulan, etanol 85%, akuades, floroglusinol, alumunium foil, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%, FeCl<sub>3</sub> 1%, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mg, KI, reagen Follin-Ciocalteau 50%, kloroform, metformin, *streptozotocin* (STZ), pakan BR1, lemak babi, sekam, obat luka iodine, asam sitrat, Na-sitrat, *buffer sitrat* pH 4.5, *Phosphat Buffer Sitrat* (PBS) pH 7.4, *tetramethylbenzidine* (TMB), *stop solution* (2N HCl), NaFis 0,9%, glukosa 10%, alkohol 70%, amonia, glukosa kit merk Gluco Dr, Rat Insulin Kit Biossay, Rat TNF- $\alpha$  Kit *Bioassay* No. E0764Ra dan air.

#### 3.2 Metode Penelitian

##### 3.2.1 Metode Eksperimen Deskriptif

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen dan deskriptif. Menurut Jaedun (2011), penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variable yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati atau diukur dampaknya. Penelitian

eksperimen juga merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja dengan cara memberikan perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan suatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti bagaimana akibatnya. Sedangkan, penelitian deskriptif menurut Nazir (2013) merupakan suatu metode dalam meneliti status sekelompok manusia, suatu objek, suatu kondisi, suatu sistem pemikiran, ataupun suatu kelas peristiwa pada masa sekarang. Tujuan dari metode deskriptif adalah untuk membuat suatu deskriptif tulisan secara sistematis, faktual dan akurat tentang fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antara fenomena yang diselidiki.

Perlakuan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah perbedaan frekuensi pemberian ekstrak *Sargassum* sp. dengan metode dekoksi pada tikus yang telah menderita diabetes mellitus. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui optimasi waktu dan konsentrasi pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi dekoksi untuk memperoleh florotanin yang dibutuhkan. Sedangkan, pada penelitian utama bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh frekuensi pemberian dekok dari *Sargassum* sp. dalam menurunkan glukosa darah dan ekspresi TNF- $\alpha$  pada organ ginjal dan aorta tikus diabetes mellitus. Selain itu juga pada penelitian ini, akan didapatkan frekuensi pemberian ekstrak yang paling efektif untuk menurunkan kadar glukosa darah dan TNF- $\alpha$  pada organ ginjal dan aorta tikus DM tipe 2.

### **3.2.2 Rancangan Penelitian**

Variabel adalah gejala, suatu fakta ataupun data yang sifatnya berubah-berubah dan tidak tetap. Variabel dibagi menjadi dua yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas (*Independent variable*) merupakan variabel yang dilihat pengaruhnya terhadap variabel terikat (*dependent variable*), sedangkan variabel terikat adalah dampak dari variabel bebas. Variabel terikat ini yang menjadi tujuan penelitian dan sumber masalah. Variabel bebas dalam penelitian

ini adalah 7 perlakuan pada tikus dan lama waktu pengamatan. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah pengaruh dekok *Sargassum* sp. terhadap penurunan glukosa darah, kadar insulin, berat badan, polifagia, polidipsia, poliuria dan kadar TNF- $\alpha$  pada organ ginjal dan aorta.

Ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas (Surakhmad, 1994).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena hanya memiliki 1 faktor yaitu perlakuan yang berbeda pada tikus coba. Dalam penelitian ini digunakan lima kelompok ulangan ( $n=5$ ) untuk tiap perlakuan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: Desain rancangan penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Desain Rancangan Penelitian RAL

Perlakuan	Ulangan					Total	Rerata
	1	2	3	4	5	( $\Sigma$ )	( $\bar{x}$ )
A	A1	A2	A3	A4	A5	$\Sigma A$	$\bar{x}A$
B	B1	B2	B3	B4	B5	$\Sigma B$	$\bar{x}B$
C	C1	C2	C3	C4	C5	$\Sigma C$	$\bar{x}C$
D	D1	D2	D3	D4	D5	$\Sigma D$	$\bar{x}D$
E	E1	E2	E3	E4	E5	$\Sigma E$	$\bar{x}E$
F	F1	F2	F3	F4	F5	$\Sigma F$	$\bar{x}F$
G	G1	G2	G3	G4	G5	$\Sigma G$	$\bar{x}G$
Total						$\Sigma i$	$\Sigma ij$

Keterangan :

A = kontrol negatif (normal) + akuades

B = kontrol negatif (normal) + dekok *Sargassum* sp 1 x sehari

C = kontrol positif (DM) + akuades

D = kontrol positif (DM) + metformin 63 mg/kg BB

E = perlakuan (DM) + dekok *Sargassum* sp 1 x sehari 2259 mg/KgBB

F = perlakuan (DM) + dekok *Sargassum* sp 2 x sehari 2259 mg/KgBB

G = perlakuan (DM) + dekok *Sargassum* sp 3 x sehari 2259 mg/KgBB

### 3.2.3 Prinsip Analisis

#### 3.2.3.1 Penelitian Pendahuluan

##### 3.2.3.1.1 Pembuatan Larutan Standar Floroglusinol (Koivikko, 2005)

Pada pembuatan larutan standar floroglusinol, langkah pertama yang dilakukan yaitu dengan melarutkan 0,01 g floroglusinol dalam 100 mL etanol 85%. Kemudian dilakukan pembuatan serangkaian larutan standar dengan mengambil larutan stok masing-masing 0; 2; 4; 6; 8; dan 10 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, lalu masing-masing ditambahkan etanol 85% hingga tanda batas, sehingga didapatkan konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi diambil 2,5 mL dan dilarutkan dalam 2,5 H<sub>2</sub>O. Selanjutnya masing-masing campuran diambil 1 mL dan dimasukkan tabung reaksi, ditambahkan 1 mL reagen Follin-Ciocalteau 50% dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. Ditunggu selama 3 menit, setelah itu diinkubasi pada ruang gelap dan dalam suhu ruang selama 45 menit. Setelah inkubasi, larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 600-700 rpm selama 5 menit. Kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer. Pembacaan serapan pada panjang gelombang 770 nm. Hasil pembacaan serapan digunakan sebagai persamaan regresi kurva standar hubungan antara konsentrasi floroglusinol (ppm) dengan absorbansi. Setelah dilakukan pengujian, didapatkan hasil bahwa titik optimasi pembuatan dekok *Sargassum* sp yaitu dengan konsentrasi 15 mL selama 22,5 menit dan nilai respons sebesar 103 mg/mL.

##### 3.2.3.1.2 Penentuan Titik Optimal Florotanin dengan respon *Surface Methodology*

Titik optimasi florotanin dari metode dekoksi yang diberikan sebagai formulasi tikus DM tipe 2 dapat ditentukan menggunakan *Respons Surface Methodology* (RSM) dengan desain CCD. Menurut Manohar *et al.* (2013). Penentuan optimasi plorotanin dari pembuatan dekoksi *Sargassum* sp. melalui *mixture – central composite design*. Penggunaan optimasi plorotanin tersebut

menggunakan 2 faktorial, yaitu waktu dan perbandingan *Sargassum* sp dengan pelarut. Range waktu perebusan yang dimasukkan kedalam aplikasi RSM adalah 15-30 menit dimana waktu 15 menit merupakan waktu yang digunakan dalam pembuatan infusa dan waktu 30 menit merupakan waktu yang digunakan dalam pembuatan dekok (Sepriani *et al.*, 2015). Perbandingan *Sargassum* sp dengan pelarut air yaitu 1;5, 1;7,5, 1;10 (Rofik dan Ratnani, 2012). Setelah faktor- faktor tersebut dimasukkan kedalam aplikasi RSM maka RSM memberikan permodelan titik-titik kombinasi secara acak dan didapatkan respon setelah melakukan pengujian dekok *Sargassum* sp. melalui titik-titik kombinasi yang telah disarankan dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Titik Kombinasi RSM

Run	Factor 1 A: Corcenration (%)	Factor 2 B: Time (minutes)	Respose 1 Florotanin (mg//mL)
1	15	22,5	
2	10	15	
3	15	22,5	
4	7,92893	22,5	
5	10	30	
6	22,0711	22,5	
7	15	22,5	
8	20	30	
9	20	15	
10	15	22,5	
11	15	11,8934	
12	15	22,5	
13	15	33,1066	

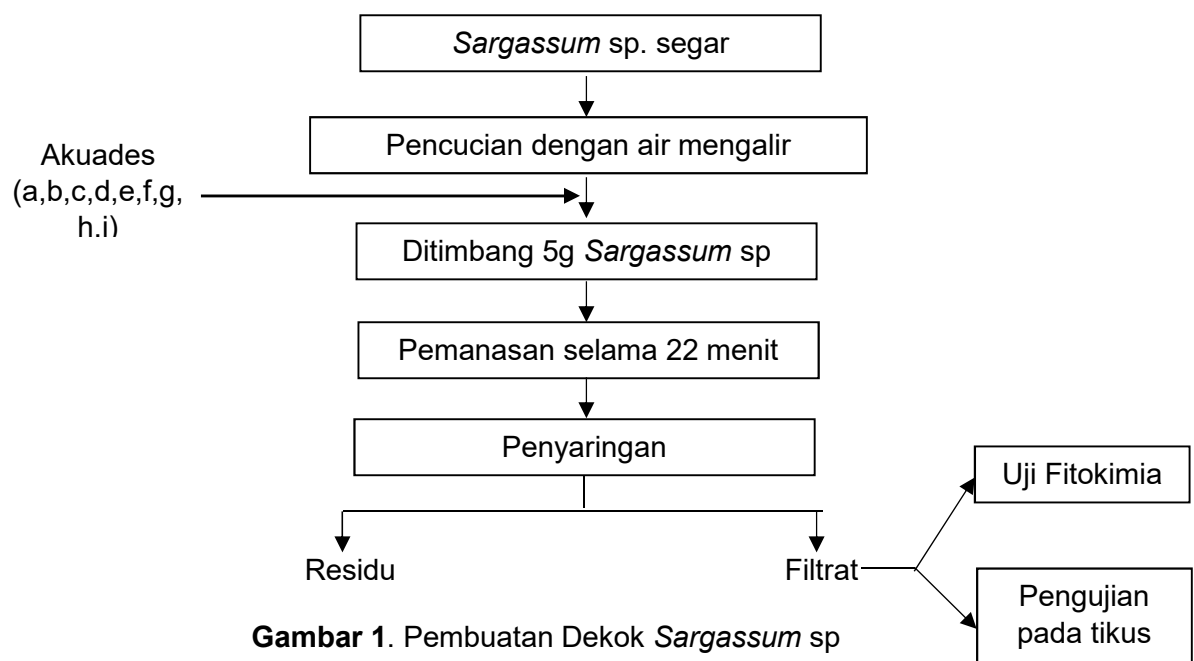
Dari tabel kombinasi diatas, dilakukan 9 perlakuan karena ada 4 titik kombinasi yang sama.

### 3.2.3.1.3 Optimasi Dekok *Sargassum* sp

Pembuatan dekok *Sargassum* sp. diawali dengan pengambilan sampel *Sargassum* sp. Di pulau poteran,, Madura. *Sargassum* sp. yang telah diambil dari perairan kemudian dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan menggunakan air tawar yang mengalir serta untuk menghilangkan garam-garam

yang masih menempel pada *Sargassum* sp. Sampel yang digunakan berupa daun rumput laut yang telah dipisahkan antar bagiannya. Daun rumput laut kemudian ditimbang menggunakan timbangan digital dan ditambahkan akuades sesuai dengan perbandingan yang didapat dari metode RSM. Kemudian dilakukan pemanasan menggunakan waterbath suhu 90°C. Lama waktu pemanasan disesuaikan berdasarkan rekomendasi dari metode RSM.

Dekok adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi sediaan herbal menggunakan air atau pengencer akuades pada suhu 90°C selama 30 menit (Anonim, 2010). Optimasi dekok *Sargassum* sp. dapat dilihat pada Gambar 8.



Keterangan :

a = 33,35 mL waktu 22,25 menit  
b = 50 mL waktu 15 menit  
c = 63 mL waktu 22,25 menit  
d = 50 mL waktu 30 menit  
e = 22,6 mL waktu 22,25 menit  
f = 25 mL waktu 30 menit  
g = 25 mL waktu 15 menit  
h = 33,35 mL waktu 11,89 menit  
i = 33,35 mL waktu 33,11 menit

Selanjutnya dilakukan pembuatan dekok *Sargassum* sp dan titik kombinasi yang diberikan oleh aplikasi RSM. Kemudian dekok *Sargassum* sp yang dihasilkan

dilakukan pengujian untuk menentukan respons total senyawa florotanin. Pengujian tersebut menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Dekok *Sargassum* sp diambil sebanyak 2,5 mL, lalu dilarutkan dalam 2,5 mL H<sub>2</sub>O pada tabung reaksi. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan pada tabung reaksi yang lain, kemudian dilakukan penambahan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* 50% dan 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% ditunggu hingga 3 menit. Setelah itu dilakukan inkubasi dalam ruang gelap suhu ruang selama 45 menit. Setelah itu diinkubasi, larutan disentrifugasi pada kecepatan 700 rpm selama 5 menit dan diambil supernatan setelah disentrifugasi. Supernatan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 770 nm dengan larutan standart floroglusinol. Hasilnya dapat dimasukkan kurva hubungan antara konsentrasi floroglusinol (ppm) dengan absorbansi. Setelah didapatkan kadar florotanin pada masing-masing titik kombinasi kemudian dimasukkan kedalam tabel RSM dan didapatkan hasil surface titik optimasi. Berdasarkan hasil dari RSM didapatkan titik optimasi pada konsentrasi 15% dengan waktu 22,5 menit dari nilai respon sebesar 103 mg/mL. Nilai respon yang didapat pada titik optimasi kemudian digunakan untuk perhitungan didapatkan dosis 2259 mg/kgBB, dosis inilah yang digunakan pada penelitian utama. Perhitungan kandungan florotanin pada masing-masing titik uji dan perhitungan dosis dapat dilihat pada lampiran 7.

#### **3.2.3.1.4 Uji Fitokimia Kualitatif**

##### **a. Polifenol**

Prinsip dari uji polifenol yaitu terjadinya perubahan warna menjadi biru sampai hitam. Hal ini disebabkan oleh reaksi antara senyawa polifenol dan FeCl<sub>3</sub> yang membentuk kompleks berwarna hijau, ungu dan biru. Reaksi ini tidak spesifik, sehingga tidak dapat digunakan untuk membedakan masing-masing golongan polifenol (Apsari dan Hari, 2011).

Prosedur pengujian kandungan polifenol yaitu dengan memasukkan 0,1 mL ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah akuades 5 mL. Kemudian dididihkan selama 5 menit menggunakan *hot plate* dan ditambah  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 5 tetes. Perubahan warna larutan menjadi biru sampai hitam menunjukkan adanya kandungan polifenol pada ekstrak (Prameswari dan Simon, 2014).

**b. Flavonoid**

Prinsip dari uji flavonoid yaitu terjadinya perubahan warna merah, kuning dan jingga setelah penambahan Mg. Hal ini disebabkan karena pembentukan struktur kinoid pada cincin B yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi lebih panjang dan planar sehingga dapat berfluoresensi (Apsari dan Hari, 2011).

Prosedur pengujian kandungan flavonoid yaitu dengan pengambilan 0,1 mL ekstrak *Sargassum* sp., dicampur dengan etanol 5 mL lalu dikocok, dipanaskan dan dikocok kembali. Kemudian ditambahkan Mg 0,2 g dan HCl 3 tetes. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya kandungan flavonoid (Prameswari dan Simon, 2014).

**c. Alkaloid**

Menurut Kayaputri *et al.*, (2014) prinsip dari uji alkaloid yaitu terjadinya endapan yang terbentuk dan perubahan warna setelah adanya penambahan reagen Dragendorff yang memiliki kandungan logam-logam bismut nitrat dan kalium iodida. Selain itu pada reagen ini, ion logam  $\text{K}^+$  berikatan dengan nitrogen sehingga terbentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap berwarna cokelat muda sampai kuning.

Prosedur pengujian kandungan alkaloid yaitu dengan memasukkan 0,5 g ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah kloroform 5 mL dan amonia 3 tetes. Kemudian dipisah fraksi kloroform dan ditambah  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M sebanyak 10 tetes, lalu dipisah menjadi bagian A, B dan C. Bagian A diberi



pereaksi Mayer, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Bagian B diberi pereaksi Dragendorff, timbulnya warna merah menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Kemudian bagian C diberi pereaksi Wagner, timbulnya warna cokelat menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Prameswari dan Simon, 2014).

#### **d. Tanin**

Prinsip dari uji tanin yaitu terjadinya perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Hal ini terjadi karena penambahan  $\text{FeCl}_3$  yang merubah warna menjadi biru kehitaman. Tanin termasuk jenis polifenol yang memiliki gugus OH sehingga mudah larut dalam air, pelarut organik maupun campuran keduanya (Alamsyah *et al.*, 2014)

Prosedur pengujian kandungan tanin yaitu dengan memasukkan 0,5 mL ekstrak *Sargassum* sp. ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah akuades 5 mL. Kemudian dididihkan selama 5 menit menggunakan *hot plate* dan ditambah  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 5 tetes. Perubahan warna larutan menjadi biru tua dan hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin pada ekstrak (Prameswari dan Simon, 2014).

#### **e. Saponin**

Prinsip dari uji saponin yaitu terbentuknya busa yang tidak hilang pada pengujian. Terbentuknya busa tersebut menunjukkan hasil positif adanya saponin. Hal ini disebabkan karena adanya ikatan glikosida yang kuat sehingga menyebabkan saponin bersifat polar (Alamsyah *et al.*, 2014).

Prosedur pengujian kandungan saponin dilakukan dengan uji busa dalam air panas dengan melarutkan 0,5 g dekok *Sargassum* sp. ke dalam 10 mL air panas lalu dikocok kuat-kuat. Adanya kandungan saponin dilihat dari busa yang tidak hilang setelah 5 menit dan setelah penambahan HCl 2N 1 tetes (Prameswari dan Simon, 2014).

## f. Steroid

Prinsip dari uji steroid yaitu terjadinya perubahan warna kuning kecokelatan menjadi biru kehijauan. Hal ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi pada golongan steroid. Reaksi ini terjadi melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik). Prosedur pengujian steroid yaitu ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL kloroform. Kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1-2 tetes  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung tersebut. Apabila terbentuk cincin berwarna cokelat maka ekstrak sampel mengandung triterpenoid. Sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Lailiyah *et al.*, 2014).

### 3.3 Penelitian Utama

#### - Permodelan tikus coba pada berbagai perlakuan

Pemodelan tikus coba pada berbagai perlakuan diawali dengan penempatan tikus wistar jantan sebanyak 35 ekor dengan berat  $200 \pm 10g$  dan usia 2-3 bulan ke dalam *individual cages* dengan masa adaptasi 7 hari untuk mengondisikan semua tikus sebelum diberikan perlakuan. Tikus coba setiap hari diberi pakan dan minum tanpa batas (*ad libitum*). Tikus coba dibagi kedalam 7 perlakuan, pada tiap perlakuannya terdapat 5 ekor tikus coba. Tujuh perlakuan ini meliputi :

Keterangan :

A = kontrol negatif (normal) + akuades

B = kontrol negatif (normal) + dekok Sargassum sp 1 x sehari

C = kontrol positif (DM) + akuades

D = kontrol positif (DM) + metformin 63 mg/kg BB

E = perlakuan (DM) + dekok Sargassum sp 1 x sehari 2259 mg/KgBB

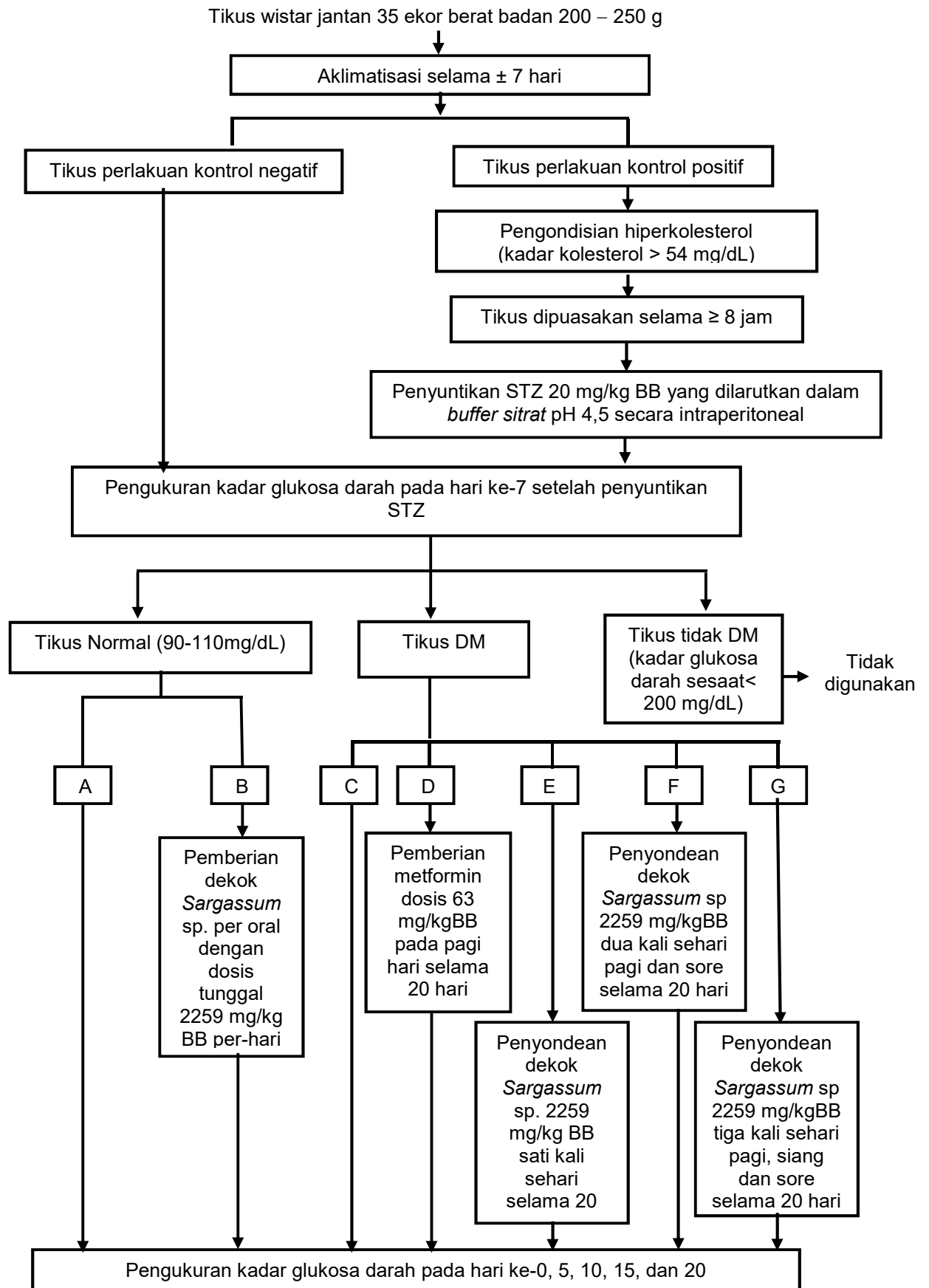
F = perlakuan (DM) + dekok Sargassum sp 2 x sehari 2259 mg/KgBB

G = perlakuan (DM) + dekok Sargassum sp 3 x sehari 2259 mg/KgBB

Preparasi diabetogenik STZ dilakukan dengan melarutkan STZ kedalam *buffer sitrat* pH 4,5. Penggunaan *buffer sitrat* pH 4,5 mengacu pada penelitian terdahulu (Erwin *et al.*, 2013). *Buffer sitrat* pH 4,5 terbuat dari campuran 26,5 mL larutan asam sitrat 23,5 mL larutan natrium sitrat yang dilakukan dalam 50 mL

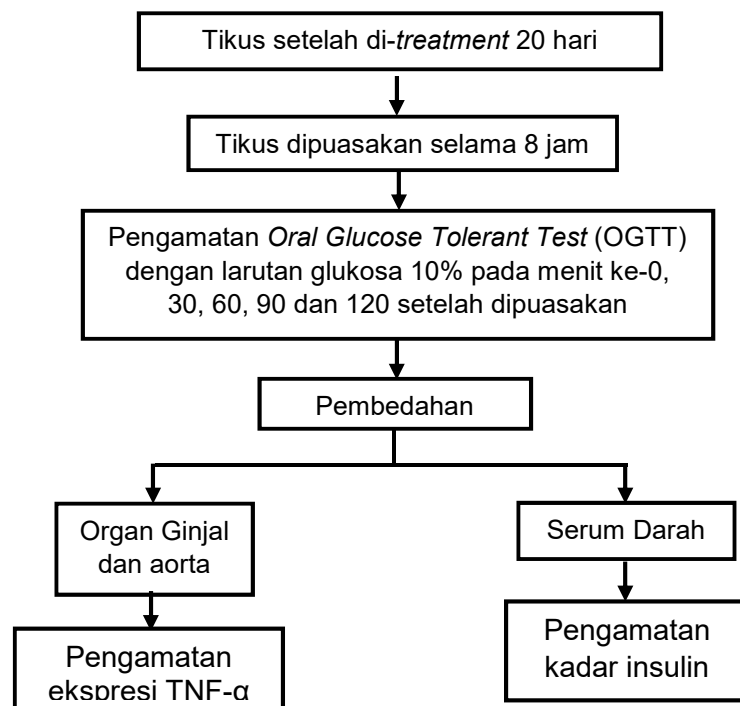
akuades. Sebelum tikus coba diinduksi dengan diabetogenik, tikus coba dipuaskan selama 8 jam agar terjadi metabolisme basal dan STZ dapat bereaksi maksimal dalam tubuh. Perlakuan A dan B diinduksi dengan larutan *buffer sitrat* sebanyak 0,2 mL, sedangkan perlakuan C hingga G diinduksi dengan diabetogenik STZ dosis 20 mg/kgBB yang telah dilarutkan *buffer sitrat*. Sebelum dilakukan penginduksian STZ, tikus coba diberi pekandengan campuran lemak babi untuk meningkatkan kadar kolesterol tikus. Penginduksian *buffer sitrat* dan STZ dilakukan di daerah intarperitonal dibawah rongga perut. Tikus diposisikan menghadap ke arah frontal hingga terlihat bagian abdomennya. Kulit tikus dicubit pada bagian abdomen hingga terasa bagian ototnya. Hasil penginduksian diabetogenik dapat dilihat setelah 7 hari dengan melakukan pengukuran kadar glukosa darah. Tikus coba yang dinyatakan positif diabetes harus memiliki kadar glukosa darah  $\leq 200$  mg mg/dL tidak digunakan. Tikus coba yang telah dilakukan permodelan ini dilakukan treatment.

*Treatment* pada berbagai perlakuan tikus coba dilakukan pada perlakuan A yaitu kontrol negatif atau dalam kondisi tidak DM dan hanya diberi akuades. Pada perlakuan B yang disonde dengan penambahan dekok *Sargassum* sp. Frekuensi 1 kali hari. Hal ini dilakukan untuk menunjukkan pengaruh dari ekstrak dekok *Sargassum* sp. Perlakuan C kontrol (DM) dan hanya diberi akuades. Perlakuan D disonde menggunakan metformin., Pada perlakuan E, F dan G disonde dengan dekok *Sargassum* sp. Frekuensi 1 kali, 2 kali dan 3 kali sehari. Pemodelan dan *treatment* tikus coba pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 2.** Pemodelan dan *treatment* tikus coba pada berbagai perlakuan

Setelah 20 hari dilakukan *treatment*, tikus coba diamati kadar glukosa darah, insulin dan ekspresi TNF- $\alpha$ . Tikus coba dilakukan pemuasaan selama 8 jam agar terjadi metabolisme basal dalam tubuh tikus. Setelah itu, dilakukan *Oral Glucose Tolerant Test* (OGTT). Tikus coba dilakukan penyondean larutan glukosa 10% pada menit ke-0, kemudian diukur kadar glukosa darah tikus pada menit ke-30, 60, 90 dan 120. Selanjutnya tikus coba dilakukan *euthanasia* secara dislokasi pada tulang leher lalu dilakukan pembedahan dari bagian abdomen sampai toraks dan dilakukan pengambilan organ. Setelah diambil, organ dilakukan pencucian dengan NaFis 0,9% untuk menghilangkan sisa darah dan dilakukan penimbangan organ. Selanjutnya dilakukan pengamatan kadar insulin darah dan ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pengamatan pada tikus coba dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 3.** Pengamatan pada Tikus Coba

### **3.3.1 Prinsip Analisis**

#### **3.3.1.1 Pengukuran Glukosa Darah (Tibrani, 2009)**

Kadar glukosa darah tikus coba ditentukan dengan metode biosensor glukosa oksidase. Darah tikus coba diukur melalui ujung ekor yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar glukosa darah dilakukan dengan melalui vena ekor tikus, kemudian darah yang keluar diteteskan pada strip yang sudah terpasang pada glucometer. Prinsip kerja dari alat ini yaitu, sampel darah akan masuk kedalam test strip melalui aksi kapiler. Glukosa yang ada dalam darah akan bereaksi dengan glukosa oksidase dan kalium ferisianida. Kalium ferisianida yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi glukosa yang ada dalam sampel darah. Oksidasi kalium ferisianida akan menghasilkan muatan listrik yang akan diubah oleh glucometer untuk ditampilkan sebagai konsentrasi glukosa pada layar. Kadar glukosa darah akan terbaca dilayar glukometer setelah 11 detik dan dinyatakan dalam mg/dL. Pengukuran glukosa darah tikus coba dilakukan setiap 5 hari sekali, yaitu hari ke 0-5-10-15 dan 20.

#### **3.3.1.2 Berat Badan, Poliuria, Polifagia dan Polidipsia (Fachrurazi, 2016)**

Berat badan tikus coba ditimbang menggunakan timbangan digital. Penimbangan berat badan tikus coba dilakukan setiap hari selama 20 hari. Penimbangan berat badan dilakukan pada hewan uji selama perlakuan dengan tujuan untuk melihat adanya perubahan berat badan pada tikus Diabetes Mellitus. Poliuria pada tikus coba diamati dengan mengukur volume urine, yaitu dengan cara menimbang sekam basah tikus. Sekam kering ditimbang pada hari ke-(n-1) dan menimbang sekam basah pada hari ke-n. Setelah diperoleh angka, kemudian dilakukan pengurangan antara berat sekam hari ke-n dikurangi berat sekam hari ke-(n-1). Hasil yang didapatkan merupakan volume urine yang dikeluarkan tikus selama 1 hari.

Polifagia tikus coba diamati dengan mengukur berat sisa pakan tikus. Pakam ditimbang pada hari ke-(n-1) dan hari ke-n, kemudian dilakukan pengurangan antara berat pakan hari ke-n dikurangi berat pakan hari ke-(n-1), sehingga didapatkan berapa pakan yang dikonsumsi tikus selama 1 hari.

Polidipsia pada tikus coba diamati dengan mengukur volume sisa minum tikus. Volume minum diperoleh dari hasil pengukuran volume hari ke-n dikurangi hari ke-(n-1) sehingga didapatkan volume air yang dikonsumsi tikus selama 1 hari.

#### **3.3.1.3 Tes Toleransi Glukosa Oral (Syah *et al.*, 2015)**

Pengukuran tes toleransi glukosa oral (TTGO) dilakukan untuk melihat kemampuan tubuh dalam menggunakan glukosa yang merupakan sumber energi bagi tubuh (Islam *et al.*, 2009). Glukosa yang diberikan pada saat TTGO dapat meningkatkan kadar gula darah. Puncak kadar glukosa darah terjadi dalam  $\frac{1}{2}$  atau 1 jam dan akan kembali normal 2-3 jam. Pengukuran tes toleransi glukosa oral (TTGO) dilakukan pada hari ke-20 dan sebelum dilakukan pengukuran terlebih dahulu untuk menghindari variasi kadar glukosa darah karena perbedaan masuknya makanan pada setiap hewan uji (Lidia, 2013). Tikus diberi larutan glukosa 10% secara oral 30 menit setelah diberi perlakuan. Pemberian larutan glukosa dengan menggunakan alat glucometer, darah diambil dari vena ekor pada masing-masing kelompok setelah 0,30,60,90 dan 120 menit (Kumar *et al.*, 2014). Dilakukan pengamatan setiap 30 menit untuk mengetahui kemampuan tubuh mentoleransi pemberian larutan glukosa hingga dapat diketahui ada tidaknya pengaruh frekuensi pemberian dekok *Sargassum sp.* terhadap kemampuan tubuh mentoleransi glukosa.

#### **3.3.1.4 Pengukuran Kadar Insulin (Handayani *et al.*, 2009)**

Pengukuran kadar insulin plasma dari sampel darah yang telah diambil sebelumnya dilakukan setelah akhir pengamatan. Kadar insulin tikus coba ditentukan dengan metode ELISA menggunakan Rat Insulin ELISA kit dari

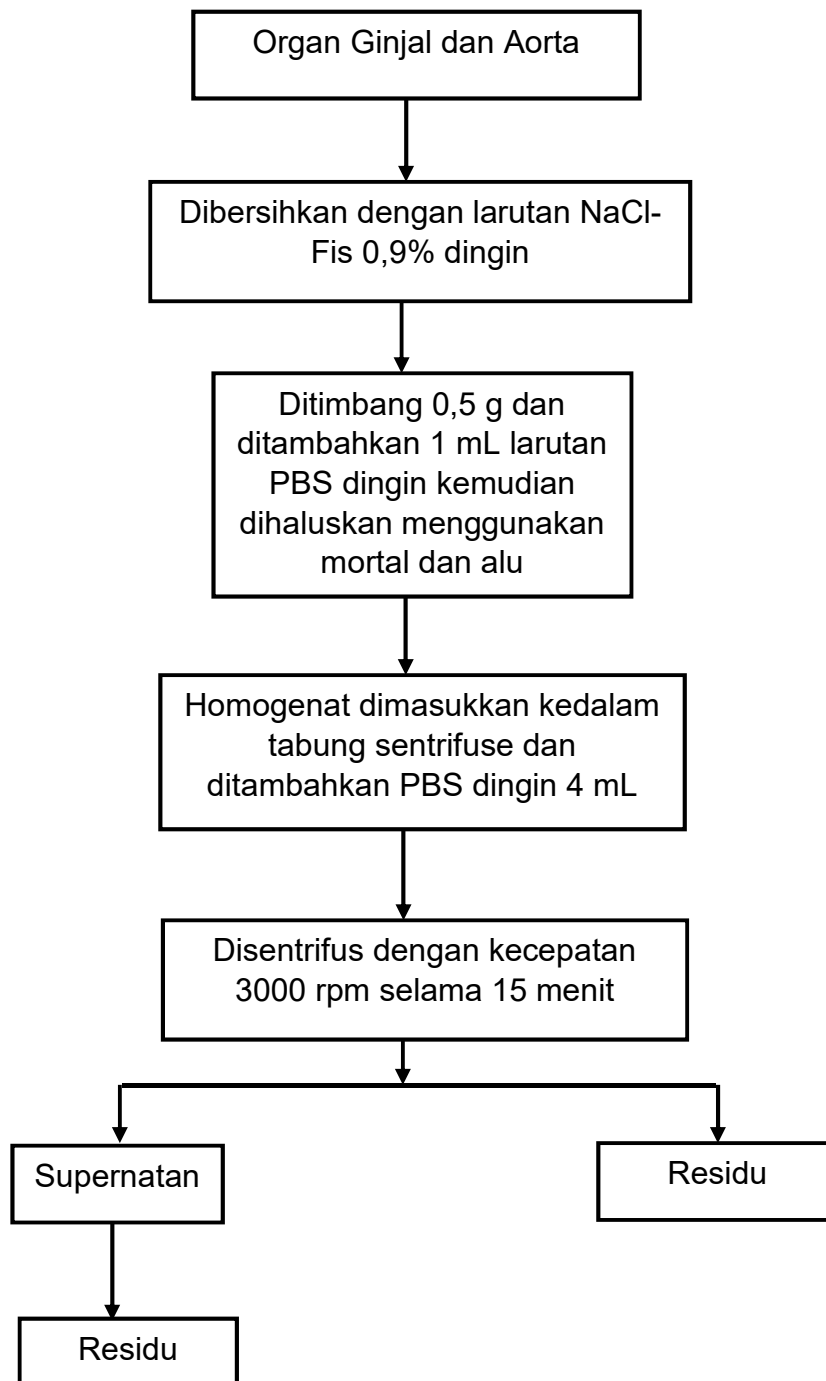
Bioassay Teknologi Laboratory No. E0707Ra, Shanghai China dan alat microplate reader. Prinsip dari uji ELISA yaitu interaksi antigen dan antibodi suatu sampel dengan melibatkan peran enzim sebagai indikator dalam reaksi. Rat INS ditambahkan ke lubang yang telah dilapisi INS *monoclonal antibody* dan akan diikat Rat INS, dilanjutkan dengan inkubasi. Antibodi Rat INS yang tidak terikat setelah inkubasi akan dilakukan pencucian hingga bersih.

Pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar insulin serum dari jantung tikus yang sudah dibedah menggunakan spuit 5 mL. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi tanpa EDTA. Sampel darah yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Setelah disentrifugasi akan terbentuk sedimen dibagian bawah dan serum dibagian atas, kemudian serum diambil dan dimasukkan ke tabung eppendorf dan diberi label. Tabung-tabung Eppendorf kemudian disimpan direfrigerator dalam suhu 4°C, kemudian sampel serum tersebut dikreasikan dengan monoclonal anti-mouse microplate dan reagen yang tersedia dalam mouse insulin ELISA kit. Setelah melalui beberapa reaksi tersebut, sampel diukur dengan alat microplate reader pada panjang gelombang 450nm (Tibrani, 2009)

#### **3.3.1.5 Ekspresi TNF- $\alpha$**

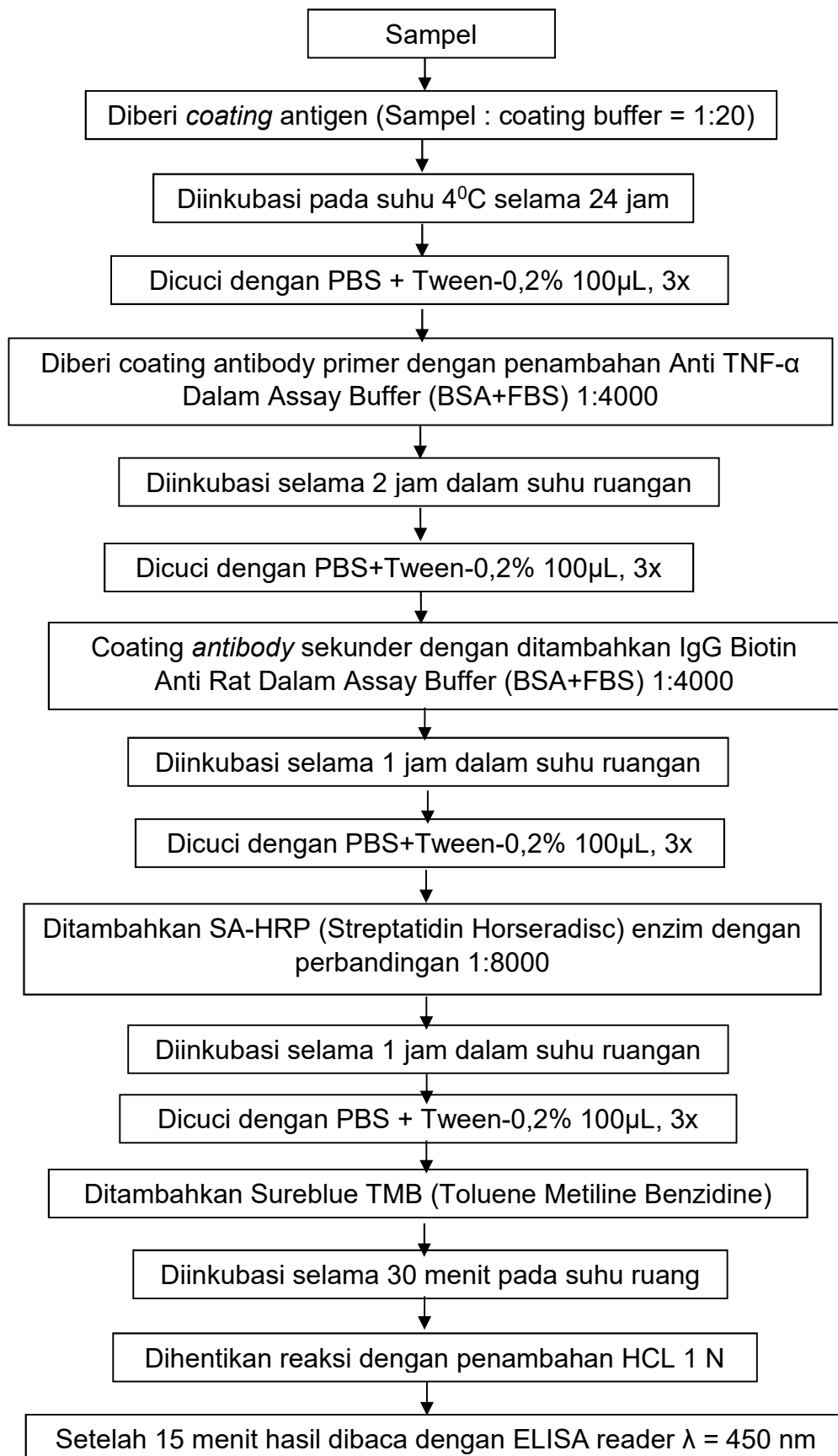
Sebelum dilakukan uji kadar TNF- $\alpha$  terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel organ ginjal dan aorta pada tikus. Preparasi sampel yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 11.





**Gambar 4.** Preparasi Organ

Organ ginjal dan aorta yang telah di preparasi kemudian diuji kadar TNF- $\alpha$  menggunakan metode ELISA Kit spesifik (*Specific sandwich enzym-linked immunisorben essay*). Pengujian TNF- $\alpha$  dapat dilihat pada Gambar 12.



**Gambar 5.** Pengukuran TNF- $\alpha$

### 3.4 Prosedur Analisis

#### 3.4.1 Analisa Data

Rancangan penelitian yang digunakan untuk parameter mikrobiologi feses dan kadar glukosa darah adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena hanya memiliki 1 faktor yaitu perlakuan frekuensi dosis yang berbeda pada tikus uji (A, B, C, D, E, F, G). Metode analisis yang digunakan adalah titik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dimana:

- $Y_{ij}$  = Perlakuan ke-i ulangan ke-j
- $\mu$  = Rataan umum
- $\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i
- $\varepsilon_{ij}$  = Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Apabila hasil analisis keragaman (sidik ragam) menunjukkan adanya pengaruh yang nyata/sangat nyata maka dilanjutkan dengan analisa Duncan 5% menggunakan program SPSS. Taraf kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $\alpha = 0,05 \%$ .